



MINISTERIO
DE ECONOMÍA
Y COMPETITIVIDAD



INSTITUTO ESPAÑOL
DE OCEANOGRAFÍA

PROYECTO MICROALGAS

PRODUCCIÓN Y DESARROLLO DE CULTIVO DE ALGAS PARA LA CAPTACIÓN DE ANHÍDRIDO CARBÓNICO Y LA PRODUCCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES

RESUMEN DE LOS RESULTADOS Y CONCLUSIONES

Eladio Santaella-Álvarez

Sede Central
Instituto Español de Oceanografía
C/ Corazón de María, 8, 4º. E-28002 Madrid, España



BANCO
ESPAÑOL
DE ALGAS
marinebiotechnology.org



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA



UNIVERSIDAD DE ALMERÍA



UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS
DE GRAN CANARIA



ABENGOA BIOENERGIA
NUEVAS TECNOLOGIAS

INSTITUTO ESPAÑOL DE OCEANOGRAFÍA
MADRID 2013

PROYECTO MICROALGAS.

PRODUCCIÓN Y DESARROLLO DE CULTIVO DE ALGAS PARA LA CAPTACIÓN DE ANHÍDRIDO CARBÓNICO Y LA PRODUCCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES.

RESUMEN DE LOS RESULTADOS Y CONCLUSIONES

ÍNDICE.....	2
1. INTRODUCCIÓN	4
2. DESCRIPCIÓN DE LAS LÍNEAS DE ACTUACIÓN	7
3. CARACTERÍSTICAS DE LOS SUBPROYECTOS	9
3.1.Creación del Banco Nacional de Algas (actualmente Banco Español de Algas). Bruno Berheide del Río	9
3.2.Cuatro subproyectos de investigación centrados en el sector académico.	10
3.2.1. Subproyecto de desarrollo de un proceso de producción de biocombustibles, y valorización de la biomasa residual, a partir de microalgas marinas. Universidad de Almería. Emilio Molina Grima <i>et al.</i>	10
3.2.2. Subproyecto de captación de CO ₂ y fotoproducción de hidrógeno por el alga eucariota Chlamydomonas. Universidad de Córdoba. Emilio Fernández Reyes <i>et al.</i>	11
3.2.3. Subproyecto de estudio de las cianobacterias (microalgas procariotas) para la producción de compuestos carbonados (polisacáridos y ácidos grasos) para la producción de biodiesel. Universidad de Sevilla. Francisco J. Florencio Bellido <i>et al.</i>	11
3.2.4. Subproyecto bioprospección, valoración del potencial de cultivo con gases de combustión, y evaluación del potencial de bioprecipitación de CO ₂ , de microalgas marinas productoras de polisacáridos. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Guillermo García-Blairsy Reina, Giovana O. Fistarol y Águeda Angulo Montesdeoca.	12
3.3.Cuatro subproyectos para la construcción de al menos cuatro fotobiorreactores a desarrollar por empresas.	12
3.3.1. Subproyecto de desarrollo y operación de una planta de demostración flexible para la producción de microorganismos fotosintéticos para la captura de CO ₂ y su valoración para la producción de biocombustibles. Abengoa Bioenergía Nuevas Tecnologías, Universidad Politécnica de Cartagena, Centro Nacional de Energías Renovables y Universidad de Murcia.	13
3.3.2. Subproyecto de construcción y puesta en operación de una planta piloto demostrativa para producción de microalgas para la obtención de biodiesel. Acciona Energía, Acciona Biocombustibles y Universidad de Almería.....	13

3.3.3. Subproyecto de captura, fijación y valorización de CO ₂ por medio de planta piloto ubicada en una central térmica del litoral. Endesa Generación, Universidad de Almería y Centro Tecnológico de Investigación AITEMIN..	14
3.3.4. Subproyecto de demostración del cultivo y procesado de microalgas en sistemas semicerrados con fertilización carbónica en el entorno de una refinería. Repsol YPF e Institut de Recerca en Energía de Catalunya.	15

4. RESUMEN DE LOS RESULTADOS 15

4.1. Creación y consolidación del Banco Español de Algas. Bruno Berheide del Río .. 15

4.2. Subproyectos desarrollados por universidades..... 22

4.2.1. Subproyecto de desarrollo de un proceso de producción de biocombustibles, y valorización de la biomasa residual, a partir de microalgas marinas. Universidad de Almería. Emilio Molina Grima <i>et al.</i>	22
4.2.2. Subproyecto de captación de CO ₂ y fotoproducción de hidrógeno por el alga eucariota Chlamydomonas. Universidad de Córdoba Emilio Fernández Reyes <i>et al.</i>	27
4.2.3. Subproyecto de estudio de las cianobacterias (microalgas procariotas) para la producción de compuestos carbonados (polisacáridos y ácidos grasos) para la producción de biodiesel. Universidad de Sevilla. Francisco J. Florencio Bellido <i>et al.</i>	28
4.2.4. Subproyecto Bioprospección, valoración del potencial de cultivo con gases de combustión, y evaluación del potencial de bioprecipitación de CO ₂ , de microalgas marinas productoras de polisacáridos. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Guillermo García-Blairsy Reina, Giovana O. Fistarol y Águeda Angulo Montesdeoca.	30

4.3.Subproyectos desarrollados por empresas..... 35

4.3.1 Subproyecto de desarrollo y operación de una planta de demostración flexible para la producción de microorganismos fotosintéticos para la captura de CO ₂ y su valoración para la producción de biocombustibles. Subproyecto ECOALGA Abengoa Bioenergía Nuevas Tecnologías, Universidad Politécnica de Cartagena, Centro Nacional de Energías Renovables y Universidad de Murcia.	35
4.3.2. Subproyecto de construcción y puesta en operación de planta piloto demostrativa para producción de microalgas para la obtención de biodiesel. Acciona Energía, Acciona Biocombustibles y Universidad de Almería.	37
4.3.3., Subproyecto de captura, fijación y valorización de CO ₂ por medio de planta piloto ubicada en una central térmica del litoral. Subproyecto ALGAPLANE. Endesa Generación, Universidad de Almería y Centro Tecnológico de Investigación AITEMIN	44
4.3.4. Subproyecto de demostración del cultivo y procesado de microalgas en sistemas semicerrados con fertilización carbónica en el entorno de una refinería. Repsol YPF e Institut de Recerca en Energía de Catalunya	49

1. INTRODUCCIÓN

La iniciativa institucional de promover un proyecto de producción y desarrollo de cultivo de algas para la captación de anhídrido carbónico y la producción de biocombustibles se gestó a partir de un discurso de la titular del Ministerio de Ciencia e Innovación, pronunciado en Madrid el 19 de enero de 2009, sobre "La inversión pública en infraestructuras científicas como respuesta a la crisis económica". En el mismo se afirmó que "respecto a las inversiones en infraestructuras científicas en el ámbito de la energía (...) destaca la construcción de dos nuevos centros de excelencia investigadora". De ellos, uno iría "orientado a la producción y desarrollo de cultivo de algas para la captación de CO₂ y producción de biocarburantes, con una inversión prevista de 8 millones de euros en 2009".

Este propósito inicial se plasmó en la implementación de un proyecto (Proyecto Microalgas), financiado con los fondos de I+D+i previstos en Plan E (Real Decreto-ley 9/2008, de 28 noviembre, por el que se crea un Fondo Estatal de Inversión Local y un Fondo Especial del Estado para la Dinamización de la Economía y el Empleo).

La gestión del proyecto fue asignado al IEO mediante un acuerdo de encomienda de gestión del Ministerio de Ciencia e Innovación de fecha 30 de junio de 2009 y publicada por Resolución de la Secretaría de Estado de Investigación de 28 de septiembre de 2009 (BOE num. 239 de 3 de octubre de 2009).

El objetivo estratégico de estas actuaciones se fijó en "garantizar, mediante la investigación y el desarrollo, el suministro energético, incrementando la contribución de las energías renovables y las tecnologías energéticas emergentes, de forma eficiente y competitiva, y su integración en el sistema energético nacional, de tal manera que su aportación mejore la seguridad de suministro, la diversificación de las fuentes de abastecimiento, mejore la protección del medio ambiente y todo ello sin que sus costes mermen la competitividad de nuestra economía. Los objetivos a alcanzar son consolidar el liderazgo de la tecnología española y de las empresas que compiten en este ámbito, mejorar la eficiencia energética de nuestra economía y reducir la dependencia económica y geoestratégica del país, impulsar la creación de nuevas empresas de base tecnológica en este ámbito con capacidad de competir internacionalmente, y atraer inversiones extranjeras en proyectos empresariales en el ámbito de la energía".

Las condiciones que justificaron la implementación de este proyecto se incluyeron en el anexo de la citada encomienda de gestión en los siguientes términos:

" En un sentido amplio, y desde el punto de vista biotecnológico, el término microalga hace referencia a aquellos microorganismos unicelulares capaces de realizar fotosíntesis oxigénica, que contienen clorofila a y otros pigmentos fotosintéticos. En este contexto, las cianobacterias se consideran, tradicionalmente, dentro del grupo de las microalgas. Por lo tanto, el término microalga tal como se emplea en este proyecto no tienen sentido taxonómico alguno y engloba un grupo muy diverso de microorganismos fotosintéticos que llevan a cabo la asimilación fotoautotrófica de formas oxidadas de bioelementos, entre los que destacan el anhídrido carbónico, que convierten en materia orgánica o biomasa.

Las microalgas se desarrollan en casi todos los hábitats conocidos, si bien la mayoría son acuáticas. El número de taxones es elevado, representando un recurso prácticamente inexplorado ya que sólo menos de 50 especies (de entre las más de 30.000 descritas) se han estudiado con detalle desde el punto de vista fisiológico y bioquímico. Menos de una decena se aprovechan bajo el punto de vista biotecnológico.

Mediante la manipulación de las condiciones ambientales en los sistemas de cultivo, el metabolismo celular de las microalgas puede dirigirse hacia la biosíntesis de sustancias de interés práctico o económico, cuya producción se persigue. Por ejemplo, sustancias de elevado interés farmacológico, como ácidos grasos, pigmentos, vitaminas, antibióticos o antivirales.

Sin embargo, una de las aplicaciones potenciales más importantes es el cultivo de microalgas para la obtención de productos de alto valor energético, como hidrógeno, hidrocarburos, hidratos de carbono y lípidos, estos últimos materias primas para la obtención, respectivamente, de bioetanol y biodiesel.

Las circunstancias actuales, de coste de los combustibles fósiles, necesidad de sustituirlos por fuentes energéticas sostenibles y no contaminantes, y también la necesidad de eliminar emisiones de anhídrido carbónico a la atmósfera, para paliar el efecto invernadero, ha hecho que la investigación sobre el uso de microalgas como fuente de energía renovable, y también como captadoras de emisiones de anhídrido carbónico, sea una línea prioritaria de trabajo en todo el mundo, tanto por las empresas como por los centros públicos de investigación.

Así, en España pueden localizarse al menos 15 grupos de investigación, pertenecientes a Centros y Universidades muy distintos, que realizan I+D, de carácter diverso, en este campo, destacando, como líneas de trabajo: manejo de cultivos de microalgas a la intemperie en reactores de cierta envergadura, para la producción de compuestos de interés práctico; aproximaciones biotecnológicas, con carácter de aplicación a medio plazo; y líneas de aproximación de genética molecular/ingeniería genética, de carácter eminentemente básico.

Asimismo, se localizan actualmente cerca de 20 iniciativas empresariales que, en mayor o menor grado de desarrollo e implicación, han iniciado proyectos de cultivo y utilización de microalgas como fuente de biodiesel, entre las que se encuentran las principales grandes empresas españolas, multinacionales, en el campo de la energía.

Desafortunadamente, la aplicación masiva e industrial de estas tecnologías no es previsible que se desarrolle a corto plazo. Existen todavía muchos factores que estudiar y conocer, tanto de carácter básico como aplicado, que requieren muchos nuevos conocimientos. A título no exhaustivo, se requiere mayor investigación en la selección e identificación de especies y variedades, que permita conocer y poner a disposición de los grupos investigadores y empresariales nuevas posibilidades; queda mucho por conocer en la optimización del crecimiento de algas y su caracterización molecular, para conseguir mayores rendimientos en la producción de biomasa, contenidos en lípidos o hidrocarburos, y otras características importantes con vistas a la capacidad de secuestro de anhídrido carbónico; se requieren mayores capacidades para el diseño de biorreactores, con las consiguientes metodologías de escalado y de pruebas piloto; y también existe un amplio campo de mejora en las tecnologías de recolección y procesamiento de biomásas de algas.

En definitiva, existen muchos cuellos de botellas que resolver para que estas importantes tecnologías, fundamentales para el futuro, tengan un desarrollo empresarial adecuado y competitivo.

Este proyecto (que se denomina, de forma simplificada, Proyecto Microalgas) va encaminado a intentar abordar algunos de estos problemas, de forma que pueda darse un impulso destacado a la investigación y al desarrollo tecnológicos en esta materia, a través de la potenciación de algunas líneas de trabajo, tanto en el sector público como en el empresarial, con el consiguiente efecto, además, de creación de empleo cualificado y permanente."

2. DESCRIPCIÓN DE LAS LÍNEAS DE ACTUACIÓN

La actuación a desarrollar dentro del Proyecto Microalgas tiene como finalidad incrementar tanto el conocimiento científico como el desarrollo y la transferencia tecnológica en los aspectos relacionados con el cultivo de microalgas. En definitiva se persigue potenciar una gran iniciativa para el desarrollo de sistemas de cultivo de algas con fines bioenergéticos.

Se pretende, por tanto, la instrumentalización de estos organismos fotosintéticos tanto para incrementar la captura de CO₂ procedente de la industria contaminante derivada del sector productor de energía como su explotación como fuente de materia prima productora de biocombustibles y bioderivados energéticos afines.

El proyecto, por ello, pretende el desarrollo de conocimientos y tecnologías encaminadas a un mejor entendimiento y optimización de la cadena de valor de la biomasa resultante del cultivo de microalgas e incidir positivamente en aspectos relacionados con el cambio climático y la obtención de biocarburantes.

Se estructura la presente actuación mediante tres ejes temáticos estratégicos y entre los que sobresalen las siguientes actividades o subproyectos:

a. Creación de un Banco Nacional de Algas (BNA), entendiendo dicha iniciativa como un servicio nacional de estudio, conservación de germoplasma y de apoyo a la promoción de bioindustrias basadas en microalgas (eucariotas y procariotas).

El BNA pretende a su vez integrar infraestructuras, material y científicos nacionales e internacionales en el desarrollo del propio banco, mediante la consolidación de las colaboraciones existentes, o mediante convenios institucionales.

En definitiva la misión de dicho BNA será la de ayudar a solventar y promover los complejos arranques iniciales de estas tecnologías, a fin de allanar la tarea a las bio-empresas.

b. Realización de un programa de investigación con el desarrollo de cuatro subproyectos de investigación centrados, principalmente, en el sector académico, pero en consonancia con las necesidades tecnológicas identificadas por parte del sector industrial relacionado con la temática. Con ello se pretende estratégicamente generar una investigación orientada a maximizar el rendimiento productivo del cultivo de microalgas y aproximar posiciones distantes que pudieran detectarse como existentes entre el sector académico y el sector industrial, favoreciendo la transferencia de tecnología y por tanto la generación de valor y aplicación de las investigaciones. Los subproyectos se centrarán en cuatro áreas de trabajo fundamentales, que son la ingeniería de procesos, la biodiversidad, la bioingeniería de las cianobacterias y los aspectos fundamentales relacionados con la aplicación de microalgas eucariotas.

c. Construcción de al menos cuatro fotobiorreactores a escala semi-demostrativa y de tipologías diferentes, a desarrollarse inicialmente en localizaciones geográficas españolas diferenciadas.

Esta iniciativa pretende, además, la constitución de alianzas estratégicas entre centros públicos de investigación y empresas productoras y distribuidoras de energía, con el fin de facilitar el desarrollo del sector y aproximar posiciones entre el mundo académico y el sector industrial. En definitiva se pretende cerrar la brecha existente entre estos dos sectores y favorecer los desarrollos y aplicaciones productivas.

3. CARACTERÍSTICAS DE LOS SUBPROYECTOS

3.1. Creación del Banco Nacional de Algas (actualmente Banco Español de Algas).

Este subproyecto tiene como fin la creación y consolidación de un banco de cepas de microalgas de ámbito estatal y sus servicios asociados, para el estudio, bioprospección, conservación de germoplasma y como instrumento indispensable para la promoción de bioindustrias.

Los objetivos planteados, son, de forma más concreta:

- Consolidar el Banco Español de Algas actualmente existente en la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria como autoridad internacional de depósito de microorganismos fotosintéticos a efectos de patentes, conforme al tratado de Budapest, destinado a la bioprospección, aislamiento, identificación y conservación de microalgas, especialmente de ambientes extremófilos, subtropicales, tropicales, marinos y de la Macaronesia.
- Dar soporte a los demás subproyectos del proyecto microalgas en cuanto al abastecimiento de especies.
- Facilitar el desarrollo de bioindustrias basadas en microalgas, especialmente para biorrefinerías, biocombustibles, biofiltración de CO₂ y de efluentes de plantas desalinizadoras y biorregulación climática (bioingeniería ambiental).

El Banco Español de Algas se constituirá como un laboratorio nacional de biotecnología de microalgas, con vocación global, abierto e integrador, que posibilite coordinar, con criterios técnicos y de eficiencia, a científicos, instituciones públicas y empresas en la tarea del aislamiento, conservación y prospección biotecnológica de microalgas con la finalidad de permitir el desarrollo de iniciativas científicas e industriales ligadas al cultivo de microalgas y, en concreto, las relacionadas con la producción de biocombustibles y la captación de CO₂.

El modelo del Banco Español de Algas que se pretende desarrollar se debe inspirar en el «modelo aplicado» que recientemente se ha impuesto en la histórica colección de microalgas UTEX (Banco de Microalgas de la Universidad de Texas, de EEUU). Asimismo, y debido al patrimonio de extremófilos del que se espera disponer, se deben aplicar aspectos del modelo de la CCME (Culture Collection of Microorganisms from Extreme Environments) que, basado en el existente en la Universidad de Oregon, financia la NASA.

Con el «modelo UTEX actual» como marco general, y dado que España aun carece de rodaje y de empresas de biotecnología de microalgas y de halofitas, el BNA deberá prestar un especial énfasis a las facetas que recientemente se han incorporado a las tradicionales de un banco de germoplasma convencional (aislamiento, identificación y conservación), e incluir las siguientes actuaciones:

- Solventar y promover los complejos arranques iniciales de estas tecnologías, a fin de allanar la tarea a las bio-empresas. Las tareas a realizar no se deberán ceñir exclusivamente a las clásicas de conservación in vitro, sino que deberán incluir datos de tecnología de cultivo (al menos a escala laboratorio), pero en condiciones ambientales de cultivo reales

(irradiación solar), tales como: tasas de crecimiento, densidades óptimas, densidades de inóculo, etc.

- Asesorar en técnicas de cultivo y aplicaciones industriales y reconducir algunas iniciativas empresariales poco realistas que se han suscitado con estas biotecnologías
- Formar especialistas en aplicaciones de microalgas.

El marco contractual elegido para desarrollar el subproyecto fue la de un convenio de colaboración firmado el 30 de diciembre de 2009 entre el IEO, la Fundación Parque Científico Tecnológico de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria y la Agencia Canaria de Investigación, Innovación y Sociedad de la Información dependiente de la Presidencia del Gobierno de Canarias. A solicitud de las partes firmantes. La implementación del Convenio se lleva a cabo por medio de una Comisión de Gestión de 6 miembros, compuesta por dos vocales designados por cada una de las partes firmantes. Los acuerdos se adoptan por unanimidad.

De acuerdo con el convenio, el IEO aportó al proyecto la financiación procedente del MICINN por importe de dos millones seiscientos mil euros.

3.2. Cuatro subproyectos de investigación centrados en el sector académico.

Estos subproyectos tratan de incidir consistentemente, desde el punto de vista fundamentalmente de instituciones académicas, en aspectos clave del conocimiento sobre esta materia, que permitan avances significativos y saltos tecnológicos a medio y largo plazo. Los cuatro subproyectos abordan cuestiones complementarias con metodologías diferentes.

Los subproyectos, que se pusieron en marcha son los siguientes:

3.2.1. Subproyecto de desarrollo de un proceso de producción de biocombustibles, y valorización de la biomasa residual, a partir de microalgas marinas. Universidad de Almería.

Se pretendían cubrir los siguientes objetivos concretos:

- a.Mantener al menos dos microalgas marinas, especialmente elegidas por su capacidad de fijación de CO₂ y tolerancia al cultivo en externo, cuyos comportamientos se tengan caracterizados en cuanto a su respuesta a la luz tanto continua como discontinua.
- b.Desarrollar un método de diseño y operación de reactores que integre la captación de energía solar con la distribución de la misma, la fluidodinámica dentro del reactor y la respuesta de las células a su frecuencia de exposición a la luz, que permita incrementar la eficiencia fotosintética de los cultivos lo más cerca posible del límite teórico del 10% de la radiación global.

- c. Desarrollar un diseño de reactor optimizado que permita mantener altas velocidades de crecimiento y eficiencia solar con el mínimo consumo de energía, permitiendo la operación estable y prolongada de los cultivos.
- d. Desarrollar estrategias de control para fotobiorreactores operados con microalgas marinas, que permitan un uso eficiente del CO₂ contenido en los gases de combustión y que no supongan una reemisión del mismo a la atmósfera.
- e. Desarrollar un método escalable de separación y procesado de la biomasa que permita el procesado de grandes volúmenes con bajo coste y consumo energético.
- f. Desarrollar un proceso integrado de valorización de la materia orgánica producida que permita aumentar la viabilidad económica del proceso y así su aplicación industrial.

3.2.2. Subproyecto de captación de CO₂ y fotoproducción de hidrógeno por el alga eucariota *Chlamydomonas*. Universidad de Córdoba.

Los objetivos del subproyecto son:

- a. Aislar mutantes de la colección de *Chlamydomonas* con una elevada capacidad de captación de CO₂ medida a través de una biosíntesis de almidón aumentada.
- b. Identificar mediante RESDA PCR las regiones afectadas por la inserción del marcador y determinar el efecto de dicha inserción en estos mutantes.
- c. Aislar mutantes de la colección capaces de sobreproducir H₂
- d. Identificar mediante RESDA PCR las regiones afectadas por la inserción del marcador y determinar el efecto de dicha inserción en estos mutantes
- e. Obtener estirpes dobles mutantes con ambos tipos de inserción, las que tienen unas reservas de almidón aumentadas y a su vez son capaces de sobreproducción de H₂.

3.2.3. Subproyecto de estudio de las cianobacterias (microalgas procariotas) para la producción de compuestos carbonados (polisacáridos y ácidos grasos) para la producción de biodiesel. Universidad de Sevilla.

Los objetivos previstos eran:

- a. Secuenciación y análisis de los genomas de las cianobacterias *Anabaena* ATCC 33047 y *Anabaena azollae*.
- b. Estudios mediante análisis transcripcional de los genes implicados en la biosíntesis de polisacáridos y en su regulación por las condiciones nutricionales/ambientales.
- c. Estudios en la cianobacteria modelo *Synechocystis* sp. PCC 6803 de los mecanismos de almacenamiento de carbono y su regulación.

d.Determinación de la capacidad de producción de TGA en *Synechocystis* sp. PCC 6803.

El IEO aporta al subproyecto la financiación procedente del MICINN por importe de cuatrocientos mil euros (400.000 €) de las que se ha transferido ya el 80%.

3.2.4. Subproyecto bioprospección, valoración del potencial de cultivo con gases de combustión, y evaluación del potencial de bioprecipitación de CO₂, de microalgas marinas productoras de polisacáridos. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.

Sus objetivos eran:

Principal:

Evaluar el cultivo intensivo e integrado de microalgas (eucariotas y procariotas) para la producción de biomasa (no lipídica) con fines energéticos, aplicando tecnologías fermentativas convencionales, asociado a la biofiltración de CO₂ de gases de combustión y a un modelo en biorrefinerías.

Específicos:

- a.Aislar y catalogar nuevas especies de microalgas (eucariotas y procariotas, unicelulares y, sobre todo, filamentosas), de ambiente marino (salobre e hipersalino), termófilo y, a ser posible, acidófilo, y que sean productoras de polisacáridos (y mucopolisacáridos), tanto en cápsula como excretados.
- b.Evaluar su potencial de cultivo intensivo en fotobiorreactores tubulares, a escala de laboratorio (1,5 L), pero en condiciones reales de cultivo (irradiación solar y sin limitación de nutrientes) de tal forma que posibilite la extrapolación de datos básicos: tasa de crecimiento, densidad máxima, densidad óptima.
- c.Evaluar la metodología de cultivo a escala piloto de las cepas seleccionadas, con sistemas de carbonatación basados en la inyección de gases de combustión industriales.

3.3. Cuatro subproyectos para la construcción de al menos cuatro fotobiorreactores a desarrollar por empresas.

Se trata de poner en marcha, al menos cuatro modelos diferentes de birreactores, en subproyectos liderados por empresas en consorcio con entidades públicas de investigación. Para ello, el IEO ha concertado su realización con las empresas más idóneas capaces de liderar y cofinanciar los siguientes subproyectos demostrativos:

3.3.1. Subproyecto de desarrollo y operación de una planta de demostración flexible para la producción de microorganismos fotosintéticos para la captura de CO₂ y su valoración para la producción de biocombustibles. Abengoa Bioenergía Nuevas Tecnologías.

Los objetivos de este subproyecto eran:

- a. Desarrollar una planta flexible que permita ensayar diferentes combinaciones de microalgas, tecnologías de producción, de concentración de la biomasa y de extracción y separación de sus componentes.
- b. Desarrollar y ejecutar un plan de pruebas en planta piloto que permita evaluar tecno-económicamente el concepto industrial.
- c. Evaluación tecno-económica del concepto industrial basada en las pruebas en la planta.
- d. Caracterización de especies de microalgas/cianobacterias con capacidad óptima de biofijación del CO₂ de fermentación en la zona de estudio.
- e. Evaluación y optimización de los diversos sistemas de cultivo en fotobiorreactores.
- f. Desarrollo a nivel de laboratorio de un proceso de tratamiento y aprovechamiento de biomasa como apoyo a escalados de demostración e industriales de dichos procesos,

3.3.2. Subproyecto de construcción y puesta en operación de una planta piloto demostrativa para producción de microalgas para la obtención de biodiesel. Acciona Biocombustibles.

Los objetivos de este subproyecto eran los siguientes:

- a. Determinar las especies de microalgas más adecuadas para la producción de lípidos aptos para la producción de biodiésel y las condiciones de cultivo idóneas para dichos microorganismos.
- b. Determinar y diseñar los fotobiorreactores más eficientes para el crecimiento de las especies de microalgas seleccionadas.
- c. Estudiar y determinar el sistema de cosechado más eficiente para la separación de las microalgas de su medio de cultivo.
- d. Establecer métodos de extracción del aceite de microalgas, refino (purificación y/o hidrogenación) y proceso óptimo de transesterificación.
- e. Desarrollar métodos de aprovechamiento de la biomasa residual obtenida y sistemas de reciclaje de todas las materias primas utilizadas en las distintas fases del proceso para un aprovechamiento integral del mismo.
- f. Instalar una planta piloto con el objetivo de conocer, desarrollar y optimizar el cultivo de

microalgas y su rendimiento de producción como primer paso hacia la escalabilidad a nivel industrial.

g. Evaluar el rendimiento de obtención de biomasa y aceite útil por hectárea y el coste final del biodiésel obtenido.

3.3.3. Subproyecto de captura, fijación y valorización de CO₂ por medio de planta piloto ubicada en una central térmica del litoral. Endesa.

El objetivo general del subproyecto era la optimización de las tecnologías desarrolladas que permitan el desarrollo científico de una planta piloto y de demostración, ubicada en una instalación industrial real, con objeto de demostrar la viabilidad de un sistema de captura, fijación y valorización de CO₂ mediante microalgas. Se desarrollará mediante el siguiente plan, fases y metodología que permitirá alcanzar los objetivos parciales indicados en cada caso:

a. Selección de microalgas. Se contempla el desarrollo de un programa de pruebas, considerando los diferentes productos que se desean obtener (biofertilizantes, biocombustibles y otros) para seleccionar diferentes cepas que serán ensayadas en externo en una planta piloto ubicada en el contexto de una central térmica litoral. En función de los resultados obtenidos se escalarán los resultados de la planta piloto en la central térmica, con el objetivo de verificar los resultados en condiciones reales.

b. Diseño y optimización de fotobiorreactores. Se dispone de diseños de fotobiorreactores desarrollados en proyectos anteriores que deben ser optimizados en cuanto a la mejora de la distribución de luz, operatividad y, especialmente, en dos aspectos determinantes: el coste (suponen la mayor partida económica de la instalación) y el consumo de energía. El diseño definitivo del fotobiorreactor debe permitir, además, la adecuada circulación de agua y nutrientes alrededor de las microalgas así como un suministro suficiente de la luz solar, lo que exige una alta relación entre superficie y volumen.

c. Ampliación de la capacidad de ensayo de la planta piloto: instrumentación, control y monitorización y operaciones en esta unidad. Se realizará el diseño del sistema de monitoreo de la planta piloto, en base a las necesidades de control de cada una de las fases que forman parte de la misma (parámetros climáticos, condiciones del medio de cultivo, refrigeración, acondicionamiento de la biomasa, valorización).

d. Programa de biorefinería. Acondicionamiento y valorización Las operaciones de cosechado y acondicionamiento de la biomasa suponen mas del 20% de los costes de producción y deben ser minimizados. Se pretende desarrollar metodologías de concentración de la biomasa que permitan pasar de la concentración inicial, 1-3 g/L, a concentraciones finales comerciales, 150-300 g/L, mediante tecnologías de bajo coste aplicables a grandes volúmenes de cultivo: floculación, centrifugación, etc.

e. Diseño de una planta de demostración (1-3 Ha). Sobre la base de los resultados obtenidos

en las fases anteriores del proyecto, así como los datos de que se disponga en cuanto al funcionamiento de los equipos y reactores, comportamiento de las diferentes cepas estudiadas, rendimientos del módulo de biorrefinería.

3.3.4. Subproyecto de demostración del cultivo y procesado de microalgas en sistemas semicerrados con fertilización carbónica en el entorno de una refinería. Repsol YPF.

El objetivo general del proyecto era demostrar, a través de una planta piloto, la viabilidad técnica y económica de la producción de biomasa proveniente del cultivo de microalgas en sistemas semicerrados con fertilización carbónica. Asimismo se realizará un estudio de la productividad del sistema utilizando CO₂ no depurado proveniente de la refinería de Repsol en Tarragona.

Para conseguir el objetivo común anteriormente descrito se han planteado los siguientes objetivos específicos:

- a. Estudiar la productividad de un sistema de cultivo semicerrado de tipo *raceway* bajo cubierta plástica de cultivo con fertilización carbónica procedente de una corriente de refinería con impurezas, comparada con una fertilización análoga con CO₂ sin impurezas.
- b. Realizar un balance energético y económico del proceso con datos experimentales de la planta piloto de producción.
- c. Seleccionar cepas de microalgas con alta productividad de lípidos aptos para la producción de biodiesel y comparar su productividad con una cepa de referencia como *Nannochloropsis gaditana* a escala de laboratorio de y de planta piloto.

4. RESUMEN DE LOS RESULTADOS

4.1. Creación y consolidación del Banco Español de Algas.

El Banco Español de Algas es miembro de la Organización Europea de Colecciones de Cultivos (ECCO) desde 2001 y de la Federación Mundial de Colecciones de Cultivos (WFCC) desde 2003, y está incluido en el Centro Mundial de Datos sobre Microorganismos (WFCC-MIRCEN) con el número de registro 837.

El Banco Español de Algas está acreditado ante el Gobierno de España como autoridad internacional para el depósito de microorganismos, conforme a las disposiciones del Tratado de Budapest, por la resolución n.º 239 de la OMPI (Organización Mundial de la Propiedad Intelectual) de fecha 28 de octubre de 2005. Esta acreditación confiere al Banco Español de Algas la función de depósito de algas con fines de reconocimiento de la propiedad intelectual ante la Organización Mundial de la Propiedad Intelectual y la Oficina Española de Patentes y Marcas.

Con la aplicación de la financiación contemplada en el subproyecto las instalaciones originales donde se alojaba el antiguo Banco Nacional de Algas fueron remodeladas en su

totalidad sin ampliar ni un metro cuadrado, pero se replantearon totalmente las áreas de trabajo (muy poco las administrativas), basándose en criterios de funcionalidad y flujo óptimo de trabajo, maximizando de esta manera el espacio disponible. El resultado es una infraestructura muy bien dimensionada y conceptualmente acertada para las tareas diarias del Banco Español de Algas.

El Banco Español de Algas ha implementado una plataforma de venta a través de la cual se ofertan productos de sus catálogos de:

- I. Cepas de microalgas y cianobacterias.
- II. ADN genómico.
- III. Medios de cultivo y agua de mar.

Estos catálogos en los que actualmente se están trabajando hacen que la colección del BEA, que ya de por sí es inédita (material genético singular), esté muy enfocada a distintas aplicaciones industriales que despertarán el interés de empresas que desarrollen actividades en dichas áreas.

Los servicios y productos que ofrece el Banco Español de Algas a empresas e instituciones de investigación y desarrollo tecnológico, que se detallan en la web www.marinebiotechnology.org, son los siguientes:

- a. Servicios Identificación de cepas por microscopía. El Banco Español de Algas realiza análisis microscópicos para la identificación de las cepas algales. La taxonomía en que se basa la identificación refleja el estado actual de la técnica en el momento de la identificación.
- b. Identificación de cepas por análisis de ADN. El Banco Español de Algas realiza la identificación de cepas de microalgas mediante el análisis de secuencias de ADN.
- c. ADN "á la carte". El Banco Español de Algas es capaz de extraer el ADN genómico de cultivos de microalgas a partir de una amplia gama de volúmenes.
- d. Depósito de cepas para patentes. El Banco Español de Algas, como Autoridad Depositaria Internacional, conserva cepas para patentes
- e. Depósito de cepas para mantenimiento. El Banco Español de Algas presta asistencia a entidades públicas o privadas que desean conservar sus cultivos en una ubicación segura para su mantenimiento.
- f. Citometría de Flujo. La citometría de flujo es una técnica para cuantificar y medir las partículas, tales como células y cromosomas, suspendidas en un líquido. El BEA está especializado en el análisis y la separación de las células de microalgas en cultivo o mezclas en poblaciones naturales.
- g. Cursos nacionales. En junio 2012 se llevará a cabo el Curso sobre Cianobacterias, diatomeas y dinoflagelados (18-23 Jun. 2012)

- h. Aceptación de donaciones de cepas. El Banco Español de Algas acepta depósito de nuevas cepas de microalgas y cianobacterias de ambientes dulceacuícolas, salobres, marinos, hipersalinos y terrestres con características especiales.
- i. Suministro de cultivos. El Banco Español de Algas suministra cultivos de algunas de las cepas de microalgas y cianobacterias incluidas en su catálogo público, en volúmenes de 1 litro.
- j. Suministro de extractos. El Banco español de algas suministra extractos de microalgas y cianobacterias bajo protocolos previamente acordados.



Fig. 4.1.1: Plano general del Banco Español de Algas remodelado.

Las actuaciones desarrolladas a este respecto fueron:

I. Bioprospección, identificación, aislamiento y mantenimiento de cepas.

Se han realizado un total de 18 campañas de bioprospección en las islas Canarias, Azores, Sahara, Parques Nacionales, aguas oceánicas y eventos de proliferación de algas nocivas. En total se tomaron un total de 926 muestras de ambientes marinos, salobres, hipersalinos, dulceacuícolas y terrestres. En el laboratorio, cada una de las muestras fue enriquecida en al menos 3 medios de cultivo diferentes, de acuerdo a la conductividad del hábitat de muestreo. Esto ha supuesto, manejar alrededor de 2.800 muestras para identificación y aislamiento tanto manual como empleando citometría de flujo con 'sorting'. Hasta el momento, el total de cepas aisladas y catalogadas es de 853, de las cuáles el 35% son axénicas. Entre ellas encontramos representantes de las divisiones: Charophyta, Chlorarachniophyta, Chlorophyta, Cryptophyta, Cyanobacteria, Dinoflagellata, Euglenozoa, Ochrophyta, Rhodophyta. Estas cepas tienen código de la colección BEA y están a disposición pública.

Además el Banco Español de Algas mantiene cepas que constituyen colecciones de uso restringido como la "colección Bimbache" que forma parte de un proyecto coordinado dirigido por el Instituto Español de Oceanografía, en el que además participan diversos grupos de investigación de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Su objetivo principal es la identificación, aislamiento y conservación de las cepas/especies fitoplanctónicas de la zona afectada por el proceso eruptivo del Mar de las Calmas y el Golfo en la isla del Hierro. El Banco Español de Algas participó en cinco campañas oceanográficas en el área afectada por la erupción submarina en la isla de El Hierro. En estas campañas se tomaron 170 muestras de 8 estaciones diferentes en la zona afectada por el volcán, a varias profundidades. Cada muestra se enriquece en tres medios de cultivo (F2, ASP12, L1) para promover y garantizar el mantenimiento de la diversidad biológica de las muestras y como un paso preliminar hacia una sola celda de aislamiento, ya sea por micropipeteado o usando un citómetro de flujo de células de clasificación. Hasta el momento se han aislado y catalogado 20 cepas. Los grupos dominantes aislados de las muestras originales son diatomeas, en particular de los géneros Chaetoceros y Thalassiosira. De las muestras enriquecidas, donde se apreció un aumento de la concentración y diversidad de organismos, se aislaron fitoflagelados y cianobacterias. Este trabajo preliminar se presentó en el 31st Annual meeting of the European Culture Collections' Organization – ECCO XXXI (<http://www.micoteca.deb.uminho.pt/eccoxxi>) bajo el título "The Submarine Volcanic Eruption of EL Hierro Island: a Unique source of microalge biodiversity for the Spanish bank of algae".

II. Criopreservación.

Se han crioconservado 300 muestras de las cuales 223 son mezclas de depósitos privados y retornos de cultivos del invernadero, 27 son clones del catálogo de biodiversidad BEA, 2 cepas de las colecciones de investigación, una cepa de las donaciones aceptadas y 47 de los depósitos por patentes.

III. Diseño e implantación de la aplicación de gestión.

Se ha completado y mejorado de la aplicación informática “Algal Culture Managment”. Se trata de una potente base de datos automatizada, que sirve de herramienta para el almacenamiento de datos de bioprospección y muestreo, gestión de los catálogos Banco Español de Algas y de los servicios que se ofrecen. Igualmente, la aplicación comprende un apartado de utilidades desde el que se realizan los informes de venta de productos del Banco Español de Algas y se analiza el contenido y distribución de datos en los catálogos. La ACM permite clasificar las cepas en varios catálogos de búsqueda: catálogo general de biodiversidad, cepas axénicas, extremófilos y cianobacterias. Además, se han generado los catálogos de potenciales aplicaciones de las cepas del Banco Español de Algas en el campo de bioactivos, biodiesel, bioetanol, cosmética, piensos, alimentación humana, nutracéutica y de los específicos con actividad antibacteriana, antivírica, nematocidas y antihelmítica. Esta base de datos es muy intuitiva, de fácil manejo y aplicable a otras colecciones. La ACM dota de contenido a la página web del Banco Español de Algas.



Fig. 4.1.2: Visión frontal del banco Español de Algas



Fig. 4.1.3: Vista del laboratorio central y de biotecnología.



Fig. 4.1.4: Cámara de cultivo



Fig. 4.1.5: Cámara de activación.

4.2. Subproyectos desarrollados por universidades.

4.2.1. Subproyecto de desarrollo de un proceso de producción de biocombustibles, y valorización de la biomasa residual, a partir de microalgas marinas. Universidad de Almería.

Personal participante.

El personal dedicado al proyecto ha estado formado por los miembros del grupo de Biotecnología de microalgas marinas BIO-173 Emilio Molina Grima, José María Fernández Sevilla, Francisco Gabriel Acién Fernández, Cynthia Victoria González López, Ana de San Pedro Triviño y los técnicos de Laboratorio Luis alcázar Pérez, Juan Torres Castañeda y Juan Antonio Membrilla Martínez, que han colaborado en la construcción de los reactores y los sistemas de preparación de medio de cultivo y acondicionamiento de gases, cosechado de la biomasa y sistemas de control.

Resultados de los ensayos en planta piloto (cultivo externo).

a) Cultivo continuo. De acuerdo con los resultados obtenidos en laboratorio, *N. gaditana* se ha cultivado en externo en la planta piloto en los tres tipos de fotobiorreactores instalados (tubulares, planos y raceway). En primer lugar, se llevó a cabo la puesta en marcha y prueba de todos los sistemas y tipos de reactor. A continuación, se procedió a realizar ensayos en continuo a una velocidad de dilución de 0.2 1/día a lo largo de diferentes meses del año (desde enero de 2012 hasta la actualidad). Como se ha comentado, el objetivo fundamental es potenciar la acumulación de lípidos de reserva. Para ello, se propone trabajar en continuo reduciendo progresivamente el aporte de nutrientes en el medio de cultivo a los reactores (hasta suministrar aproximadamente el 40% de los nutrientes), si bien, en el caso de los reactores tubulares se pudo además llevar a cabo una estrategia de cultivo en dos fases con el objeto de comparar ambos *modus operandi*. Respecto a los reactores tubulares, las productividades de biomasa para cada reactor son similares en todos los casos salvo en el ensayo con menor aporte de nutrientes (40%), en el cual, debido a la limitación de nutrientes, desciende desde valores superiores a 0.22 hasta 0.17 g/l día. En cuanto al contenido en lípidos totales de la biomasa, éste desciende un poco cuando se comienza a privar de nutrientes a los cultivos, pero aumenta en el caso del ensayo llevado a cabo con el menor aporte de nutrientes (40%) pasando de un porcentaje en lípidos en torno al 30% a valores cerca del 40%. Respecto a los ácidos grasos, se observa un comportamiento similar llegando a valores en torno al 23%, lo cual supone que alrededor del 50% de los lípidos totales de la biomasa son saponificables. No obstante, a pesar de que en el ensayo con menor concentración de nutrientes el contenido en lípidos y ácidos grasos de la biomasa es el mayor de los alcanzados, al ser más baja la productividad de biomasa hace que la productividad de lípidos y ácidos grasos baje.

En cuanto a los reactores raceway, la mayor productividad de biomasa, de 0.22-0.26 g/l día, se obtuvo en el ensayo llevado a cabo con el medio de cultivo más pobre (40% nutrientes), si bien también ha de tenerse en cuenta que entre los distintos ensayos se produjo un cambio estacional con un aumento de la irradiancia y de la temperatura. La productividad de biomasa es similar a la alcanzada en los reactores tubulares, si bien no son comparables debido a que

los ensayos en los tubulares se hicieron en los meses de enero y febrero, frente a estos ensayos en los raceway hechos en marzo-julio. En cuanto al contenido en lípidos totales, se observa un efecto similar al obtenido en los reactores tubulares: inicialmente desciende pero aumenta en el ensayo con la mayor reducción de nutrientes, llegando a valores en torno al 20%, muy inferior a los determinados en los tubulares. No obstante, el mayor contenido en ácidos grasos de la biomasa se obtiene en el ensayo llevado a cabo aportando la mitad de nutrientes que con el medio estándar, siendo además elevada la proporción de lípidos saponificables frente a los totales. Teniendo en cuenta los datos de cultivo, se observa que las mayores productividades tanto de lípidos como de ácidos grasos son inferiores a las determinadas en los reactores tubulares. Respecto a los reactores planos, la productividad de biomasa osciló entre 0.09 y 0.17 g/l día, siendo ésta similar para las orientaciones este-oeste y norte-sur. Además, en los reactores se simulan distintos espaciados (0.5, 1.0 y 1.5 m), observándose que los reactores que disponen de un mayor espaciado proporcionan una productividad de biomasa algo superior. En cuanto a la composición de la biomasa, se observa un mayor contenido en lípidos cuando se reduce el aporte de nutrientes hasta el 40%, alcanzando valores en torno al 25%. El contenido en ácidos grasos fue mayor en el ensayo con el 50% de nutrientes, llegando al 14% de ácidos grasos. En los reactores planos norte-sur los resultados obtenidos fueron similares. En ambos, tanto el contenido en lípidos como en ácidos grasos de la biomasa es similar al alcanzado en los reactores raceway, si bien las productividades ligeramente inferiores.

b) Cultivo continuo en dos fases. Se llevó a cabo un cultivo en dos fases en los reactores tubulares con el objeto de observar si un cultivo con total privación de nitrato tras un cultivo en condiciones normales consigue inducir la acumulación de ácidos grasos, tal y como ocurría en los cultivos llevados a cabo en laboratorio a pequeña escala. De esta manera, se inoculan los reactores empleando el medio de cultivo estándar, se dejan en discontinuo hasta que alcanzan una concentración de biomasa superior a 1 g/L y, seguidamente, se cultivan en modo continuo a una velocidad de dilución de 0.2 1/día utilizando el mismo medio estándar. Una vez alcanzado el estado estacionario, se centrifuga la biomasa con objeto de eliminar el sobrenadante y la pasta de microalgas se resuspende en medio de cultivo libre de nitrato para llevar a cabo un cultivo en discontinuo durante 12 días. Las productividades de biomasa fueron altas en la primera fase de cultivo (0.4 g/l día), mientras que en la segunda fase de cultivo la productividad de biomasa es más baja debido a la deficiencia de nitrato (<0.05 g/l día en el día 12). La composición bioquímica de la biomasa recuperada al finalizar las dos fases de cultivo se analizó, observándose un aumento del contenido en lípidos (resultando del 30%) y en ácidos grasos (27%) al final de la segunda fase de cultivo con respecto a la primera fase y una reducción paralela del contenido en proteínas (alcanzando un 26%).

Consideraciones finales

El desarrollo del presente proyecto ha permitido reformar una planta de producción de microalgas a través de la cual se ha avanzado en el desarrollo de la tecnología necesaria para depurar gases de combustión y obtener biocombustibles empleando cultivos de microalgas como materia prima. *N. gaditana* se propone como una buena candidata para la producción de biodiesel. La optimización a nivel de laboratorio de las condiciones de cultivo llevada a cabo aportó una valiosa información de partida para su estudio a escala planta piloto en externo. La estrategia de cultivo en dos fases se confirma como una posible alternativa para potenciar la acumulación de ácidos grasos, consistiendo en una primera fase en continuo bajo condiciones óptimas de crecimiento de biomasa seguida de una fase en discontinuo carente

de nitrato para favorecer la acumulación de lípidos de reserva. Toda la infraestructura con la que se ha dotado a la planta permitirá, a futuro, optimizar el funcionamiento de los sistemas con el objetivo de lograr un completo desarrollo a nivel de planta piloto del proceso propuesto que haga posible hacer que esta tecnología resulte viable y atractiva desde todos los puntos de vista. Por último, cabe mencionar que los resultados obtenidos a lo largo de este proyecto han sido complementarios a los del proyecto AlgaPlanE (Captura, fijación y valorización del CO₂ por medio de planta piloto ubicada en una central térmica del litoral).

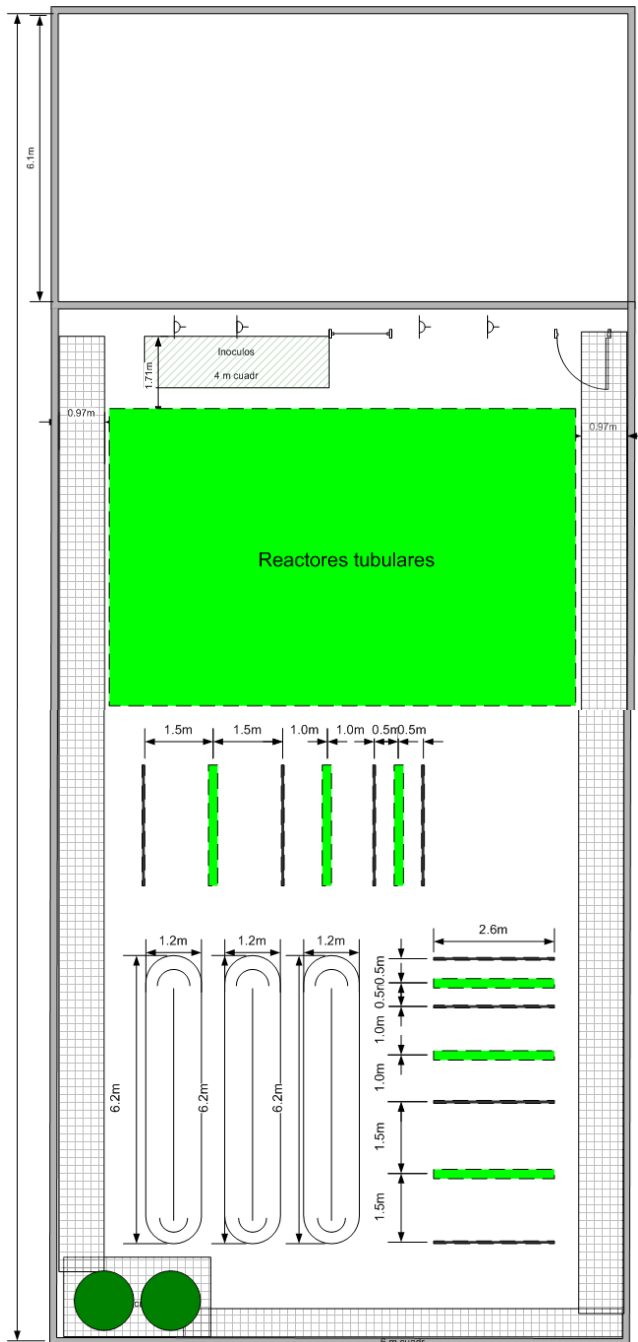


Fig. 1: Plano general de la instalación de la planta piloto de cultivo de microalgas marinas de la Universidad de Almería
Superficie total 300 m²



Fig. 2: Panorámica de la instalación externa con los distintos tipos de fotobiorreactores construidos e instalados. Al fondo el edificio del laboratorio de preparación de medios de cultivo, cosechado de la biomasa, producción de gases de escape y control de toda la instalación



Fig. 3: Fotobiorreactores tubulares de 400 L de capacidad.



Fig. 4: Fotobiorreactores planos.de 350 L de capacidad



Fig. 5: Fotobiorreactores raceways de 1500-2000L de capacidad.

4.2.2. Subproyecto de captación de CO₂ y fotoproducción de hidrógeno por el alga eucariota Chlamydomonas. Universidad de Córdoba.

Personal responsable.

El proyecto fue desarrollado por personal del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Córdoba bajo la dirección del Dr. D. Emilio Fernández Reyes.

Resultados y conclusiones.

El análisis de los resultados del subproyecto permite alcanzar las siguientes conclusiones:

- a. Se han escrutado unos -22.000 mutantes insercionales para dos fenotipos diferentes: acumulación de almidón y deficiencia fotosintética.
- b. Se ha desarrollado un método para la determinación de almidón en placa.
- c. Se han seleccionado un total de 29 mutantes que acumulan al menos 1,5 veces más almidón que la estirpe parental, así como 41 mutantes afectados en fotosíntesis y/o mecanismos de fotoprotección.
- d. La acumulación de H₂ en 31 de los mutantes fotosintéticos fue del doble o superior a la estirpe parental. En el mejor de los casos (mutante 2s.1F) se consiguió producir 3,3 ml de H₂ por litro de cultivo, lo que supone una mejora de 4,2 veces respecto a la estirpe parental.
- e. Las lesiones genómicas han sido localizadas en 28 de los mutantes aislados (19 fotosintéticos y 9 de almidón).
- f. El mutante p22.3 acumula más almidón que la estirpe parental en todas las condiciones ensayadas y es capaz de degradar este compuesto con normalidad.
- g. Los mutantes p22.3 y ps9.2 producen en condiciones fotosintéticas y presencia de acetato hasta 110 y 40 veces más H₂ que la estirpe parental, respectivamente.
- h. En los mutantes p22.3 y ps9.2, el aumento en la producción de H₂ no tiene lugar a través de las rutas acopladas a la degradación de almidón.
- i. Los mutantes p22.3 y ps9.2 están afectados en la misma región del cromosoma 9, con deleciones de diferente tamaño (40 y 15 Kb aproximadamente, respectivamente), y que estarían afectando a 4 en común, que corresponderían con una N-acetiltransferasa (GCNS), una proteína de unión a RNA (RRM), un putativo gen de función desconocida, y una proteína con homología a SEC24C que podría estar involucrada en el tráfico vesicular.

La complementación de los mutantes p22.3 y pS9.2 con diferentes construcciones de los genes RRM y GCNS, no revierte el fenotipo de acumulación de almidón ni el de producción de H₂.

4.2.3. Subproyecto de estudio de las cianobacterias (microalgas procariotas) para la producción de compuestos carbonados (polisacáridos y ácidos grasos) para la producción de biodiesel. Universidad de Sevilla.

Personal responsable.

El proyecto fue desarrollado por personal del Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis de la Universidad de Sevilla-CSIC bajo la dirección del Dr. D. Francisco J. Florencio Bellido.

Resultados y conclusiones.

En este proyecto se fijaron una serie de objetivos tendentes a analizar el potencial de las cianobacterias para la producción de compuestos de carbono con interés energético, bien directamente vía la síntesis de ácidos grasos, fácilmente convertibles en ésteres, base del biodiesel, o bien mediante la producción de polímeros de carbohidratos que puedan ser posteriormente fermentados para la producción de distintos alcoholes, como es el caso del bioetanol. Para este estudio se seleccionaron dos estirpes de cianobacterias filamentosas del género *Anabaena* que son fijadoras de dinitrógeno y con una alta capacidad para fijar CO₂ atmosférico; *Anabaena* ATCC 33047 y *Anabaena azollae*, y una cianobacteria unicelular no fijadora de dinitrógeno considerada un organismo modelo en estudios de metabolismo fotosintético, *Synechocystis* sp. PCC 6803, de la que se tiene un amplio conocimiento genético y fisiológico. En última instancia, el estudio a nivel molecular de las cianobacterias seleccionadas permitirá dilucidar la idoneidad de su utilización futura para la producción de biocombustibles, a partir de la fijación fotosintética del CO₂. Para ello tanto la secuenciación de los genomas de las dos estirpes de *Anabaena*, como el estudio transcripcional de genes relacionados con procesos que afecten a la producción de dichos compuestos, y la caracterización de la producción de los mismos bajo distintas condiciones de crecimiento constituyen un elemento fundamental a la hora de poder ser utilizadas en futuras aplicaciones biotecnológicas.

Los resultados obtenidos permiten resaltar las siguientes conclusiones acerca de la utilización potencial de las cianobacterias como organismos capaces de producir biocombustibles y/o sus precursores:

- a. Se ha realizado la secuenciación de los genomas de las 2 especies de *Anabaena* previstas. En el caso de *Anabaena azollae*, la secuenciación de dicho genoma indicó que en realidad dicha estirpe era *Anabena variabilis* sp. Este dato fue corroborado por la comparación con la secuencia de dicho genoma disponible en la base de datos CYANOBASE. El genoma de la especie *Anabaena* ATCC 33047 se ha completado también, aunque el ensamble fino del mismo no se ha podido completar hasta el momento, no obstante por el número de genes identificados en torno a 8000, sugiere que esta toda la secuencia de su genoma incluyendo los plásmidos. El estudio en detalle de los genes que codifican para proteínas (ORF), indican la existencia de genes relacionados en ambas cianobacterias con los procesos de biosíntesis y secreción de polisacáridos e igualmente con toda la maquinaria para la biosíntesis de ácidos grasos detectados. Igualmente el análisis comparativo con otras especies de *Anabaena* sugiere un núcleo de genes conservados entre ellas bastante amplio y por tanto una gran conservación y proximidad filogenética entre dichas especies.

- b. En el estudio transcriptómico de la cianobacteria *Anabaena variabilis* realizado se han secuenciado unos 300000 cDNAs a partir del RNA, lo que se denomina técnica de RNA seq. El posterior análisis de dichas secuencias nos ha mostrado un alto número de genes expresándose en las dos condiciones de cultivo analizadas. En este informe se han presentado aquellos genes que se expresan más activamente tanto en alto CO₂ (3%) como en aire (0,04%). Los resultados obtenidos permiten establecer el modelo diferencial de expresión génica en ambas situaciones metabólicas. Se ha podido constatar en relación al metabolismo del carbono, la elevada expresión de genes en alto CO₂, relacionados con la síntesis de polisacáridos que son eventualmente excretados al medio.
- c. En la cianobacteria *Synechocystis* sp PCC 6803 se ha realizado un amplio estudio tanto en la estirpe silvestre como en dos mutantes, uno carente de la enzima glutamina sintetasa (S) y otra estirpe carente de la enzima Ferredoxina –glutamato sintasa (G). Estos mutantes permiten que exista una mayor proporción de compuestos de carbono respecto a aquellos que contienen carbono y nitrógeno. Se han analizado tanto la producción de glucógeno, carbohidratos totales, ácidos grasos y proteínas, tanto en alto y bajo CO₂, como en distintas fuentes de nitrógeno, nitrato o amonio. Los resultados obtenidos permiten concluir que, como punto esencial, la reducción del flujo de formación de compuestos carbono-nitrógeno, incrementa de una forma significativa la acumulación de carbono, ya sea en glucógeno o ácidos grasos. En nuestro caso, es el glucógeno el polisacárido que presenta una mayor acumulación. El uso de un mutante incapaz de acumular glucógeno permite una mayor acumulación de ácidos grasos que la estirpe silvestre corroborando la hipótesis del control de flujo carbono-nitrógeno como elemento clave a la hora de determinar la partición metabólica en la célula de carbohidratos, proteínas y lípidos.

Como conclusión final de este proyecto podemos señalar que el uso potencial de las cianobacterias en la producción de biocombustibles está actualmente en una fase expansiva a nivel básico y comienzan a aparecer estudios más aplicados. En la mayoría de los casos se están empleando cianobacterias unicelulares no fijadoras de dinitrógeno, como es en nuestro caso *Synechocystis*, que se utiliza además como modelo de ingeniería metabólica. La utilización de cianobacterias fijadoras es más modesta y la razón principal reside en que al eliminar una fuente de nitrógeno como nitrato o amonio estas especies pueden fijar dinitrógeno atmosférico, en estas condiciones solo en alto CO₂ se observa un desbalance suficiente entre el metabolismo del carbono y del nitrógeno capaz de producir una acumulación significativa de polímeros de carbono, en especial de polisacáridos, no así de ácidos grasos, para ello será necesario interferir en dichas rutas, lo que podría aumentar la cantidad de ácidos grasos sintetizados y eventualmente producir un biocombustible tipo biodiesel.

4.2.4. Subproyecto Bioprospección, valoración del potencial de cultivo con gases de combustión, y evaluación del potencial de bioprecipitación de CO₂, de microalgas marinas productoras de polisacáridos. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.

Personal responsable.

El desarrollo del proyecto corrió a cargo de:

- Investigador principal: Dr. Guillermo García-Blairsy Reina
- Coordinador científico del proyecto: Dra. Giovana O. Fistarol
- Técnico: Águeda Angulo Montesdeoca

Resultados y conclusiones.

El proyecto concluyó una serie de experimentos de evaluación del potencial de la utilización de microalgas como sustrato para la producción de metano, estimándose la producción de energía a partir de microalgas (basándose en la producción de biogás) y su viabilidad como sustrato en una Planta de Biogás (BPC). Este informe se utiliza para proponer la aplicación de una BPC en Gran Canaria junto a una planta de tratamiento de aguas residuales (EDAR). Se ha logrado, además acotar una serie de resultados sobre el potencial de las microalgas como sustrato.

Los resultados de los distintos experimentos fueron los siguientes:

- a) Control de crecimiento de las algas. Medición de peso fresco del total del experimento

Uno de los objetivos del proyecto era implementar grandes volúmenes (5l) de cultivos de algas en fotobiorreactores, estudiando además el crecimiento de la microalga que se está cultivando.

Debido a las características de estos organismos fotosintéticos (cianobacterias filamentosas, que puede formar grumos), no todos los métodos para medir el crecimiento son adecuados.

Actualmente, el método aplicado en el BEA, fue el de medir el peso fresco (la biomasa se filtró a través de un tamiz con la luz de malla adecuada, adaptada a cada especie, midiéndose el peso fresco total, y después, peso seco y el peso seco libre de cenizas (AFDW)).

Sin embargo, este método llevaba demasiado tiempo además de no ser muy preciso.

No se pudieron aplicar métodos que requieren toma de muestras de un cierto volumen de cultivo (por ejemplo la clorofila, ya que el cultivo no tenía una distribución homogénea en el PBR).

Se tuvo que poner en marcha un nuevo sistema de cultivo en PBR de 5 litros para poder disponer de datos sobre biomasa y crecimiento, un método fácil y de bajo consumo de tiempo y a la vez fiable para poder medir la biomasa de alga y la tasa de crecimiento.

La idea propuesta fue, sabiendo el peso de la botella, el volumen exacto del medio de cultivo y la cantidad exacta de biomasa inicial en el cultivo, se podría pesar el sistema entero resultando la diferencia con el sistema inicial, el incremento en peso de la biomasa.

Como resultado, el experimento mostró una muy buena correlación inversa entre la concentración y el peso de algas según se expone en la siguiente figura:

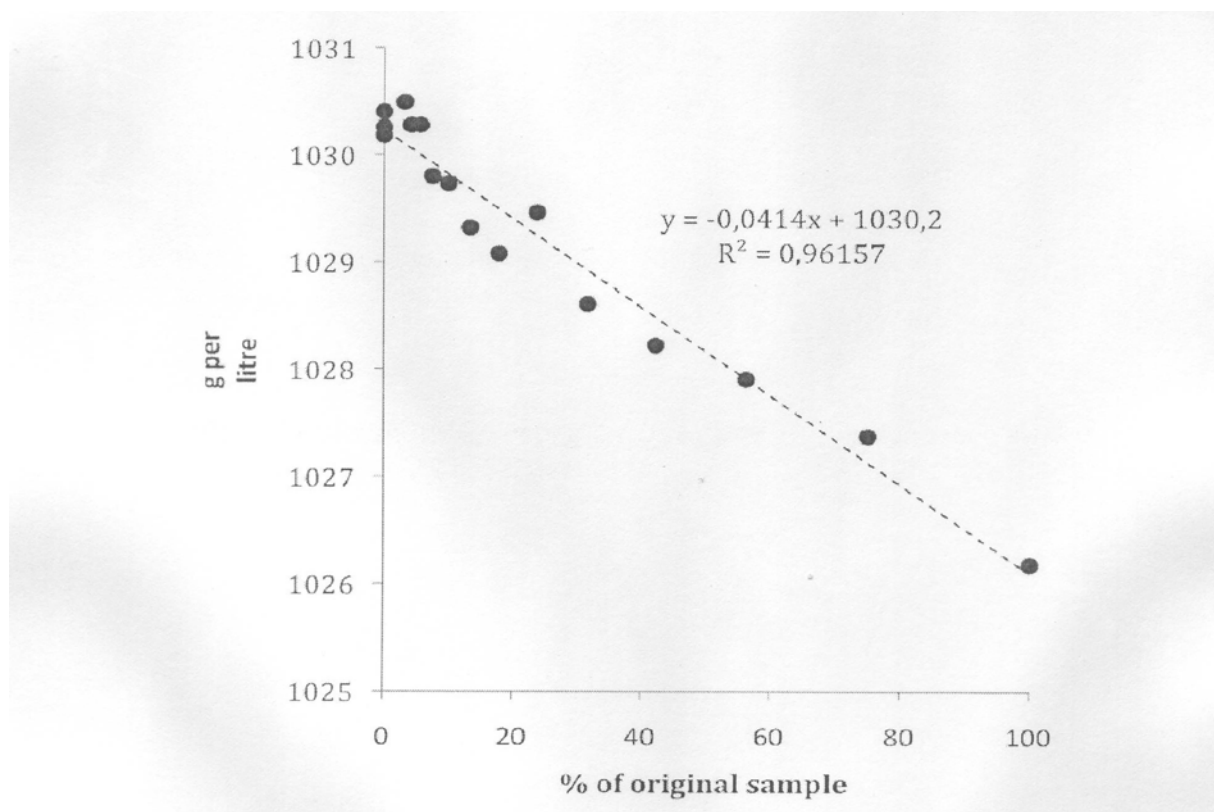


Fig. 4.2.4.1: Relación entre la concentración de algas (representado por el porcentaje de la muestra de algas original, en una serie de dilución) y el peso de todo el sistema (cultivo de algas botella + medio + biomasa de algas). Hay una correlación inversa entre la concentración de algas y el peso del sistema lo que muestra que la densidad de las algas era menor que la densidad del medio.

b) Pruebas y puesta en práctica de las diferentes técnicas de cosecha para mejorar y facilitar esta parte del proyecto

La bioenergía tiene como objetivo encontrar una microalga adecuada para ser utilizada como fuente de biomasa para la producción de biocombustible.

El proyecto tiene como objetivo encontrar no sólo un alga hiperproductora de metano, sino también un alga que no requiera costosos métodos de cultivo y cosechado. Por lo tanto, de acuerdo con este objetivo, durante el crecimiento de las algas, hemos analizado el método de cosechado (por ejemplo, filtración, centrifugación, etc.) que fue necesario aplicar y el tiempo usado en el proceso. Debido a los objetivos del proyecto, en su mayoría centrados en las cianobacterias filamentosas obtenidas por filtración (un método más barato que la

centrifugación). Por ello, los esfuerzos iniciales fueron para comprobar el tiempo necesario para filtrar cada mezcla de cianobacterias filamentosas en las que se estaba trabajando.

La tabla siguiente (1) muestra el tiempo total, y el tiempo de filtración requerido para cosechar las algas prueba, utilizando redes de plancton tradicional.

Table 1. Results on the total time and filtration time required to harvest the algae tested.

Algae code	Repli c.	Total time (min)	Filtration T (min)	Volume filtrated	Total weight filtered (Pw g)	Mesh-size of the net (um)
Nostoc AD ¹	1	>1.5h	> 1h	5 L	61.7	50
CBV 0707 6y	1	~1h	± fast	5 L	237,9	50
Spirulina						
CBV 0707 7d	1	55	20	5 L	612.4756	50
SAH 1107 10b	1	70	35-40	5 L	549.9535	50
	1	60	15	1.3 L	94.86	50
SAH 1107 12z	1	60-70	40	5 L	388.4827	50
	1	50	15-20	5 L	122.1	50
	1	50	15-20	5 L	124.4	50
	1	50	15	5 L	134.4	50
	1	60	5	1.3 L	118	50
CBV 0707 8z	1	60	2	5 L	425	50
LA 0909 1y	1	60	30	5 L	390.0306	50

¹ These cultures needed some other kind of harvesting method (reason: became dominated by unicells or thin filaments).

También se utilizó un sistema vibratorio para la redes de plancton, para observar si se disminuía el tiempo de la cosecha. La tabla 2 muestra los resultados de filtración utilizando este sistema.

Table 2: Results on the total time and filtration time required to harvest the algae using a vibratory systems for the plankton nets.

Strain	Replicates	Total time*	Filtration T (min)*	Total weight filtered (Pw g)*	Mesh-size of the net (um)	Responsible
CBV 0707 7d	2	47,5	12,5	489,7	50	PG

* average for the 2 replicates

El sistema vibratorio no funcionó con todas las cepas.

Se observó que debido a que estábamos interesados principalmente en cianobacterias filamentosas marinas, algunas podrían formar biofilms, que tenían dos características destacables:

- cuando se detenía la aireación en los cultivos, los filamentos tendían a flotar, la formación de una biomasa concentrada en la superficie del medio era muy fácilmente cosechable
- También tendían a formar biofilms, Esta biomasa podía ser también fácilmente recolectadas.



Figura 4.2.4.2: La recolección del biofilm que se forma en los cultivos con una espátula de: (a) o incluso con las manos (b).



Figura 4.2.4.3: La recolección de la biomasa concentrada en la superficie del agua después de anular la aireación.

c) Uso de los gases de combustión como fuente de carbono para el cultivo de microalgas

Seis cepas de microalgas fueron probadas para ver su tolerancia a las emisiones de gases de combustión: *Tetraselmis*, *Scenedesmus*, *Chlorococcum*, *Chlorella*, *Nostoc* y *BNA 10-046*.

Las emisiones de CO₂ en los gases de combustión producidos por el quemador en el BEA alcanzaron ~ 1% (véase el anexo 2).

Las pruebas mostraron que las algas son capaces de crecer, con la entrada de gases de combustión (aunque debemos tener en cuenta que las concentraciones de CO₂ que alcanzaron no fueron muy altas).

Se concluyó que si el gas de combustión era mejor que el control (entrada sólo CO₂ puro) el crecimiento dependía del alga: *Tetraselmis* creció mejor con los gases de combustión, no

hubo diferencias entre el control y el tratamiento de gases de combustión para *Chlorococcum* y *Chlorella*, y *Scenedesmus*, *Nostoc* y BNA 10-046 crecieron mejor con el control.

Se observó crecimiento con los dos tratamientos para todas las algas.

d) Prueba de metano

Durante el proyecto, se realizó un promedio de 1 ensayo de metano por mes (teniendo en cuenta que estas pruebas pueden durar, en promedio, 30 días, más el tiempo de preparación).

A partir de estos ensayos se obtuvo respuesta de varias cuestiones, que se presenta en el informe principal.

Tabla 3.- Comparación del rendimiento de metano entre macro y microalgas

		Methane yield $\text{m}^3 \text{kg}^{-1} \text{gVS}^{-1}$	
		FW bact	SW bact
macroalgae	Ulva	0.019	0.014
	Gracilaria	-0.006	0.075
	Hypnea	0.004	
	Cystoseira	0.023	0.123
microalgae	EDAR T1	-0.029	0.193
	BNA 20 002	-0.092	0.133
	CBV 0707 6y	-0.111	0.052

Nota:

- EDAR T1: Comunidad microalgal presente en el tanque de tratamiento primario de la EDAR (Algas filamentosas tipo *Oscillatoria*, *Leptolyngbya*, *Phormidium* y cianos unicelulares y clorofíceas tipo *Synechococcus*, *Chlamydomonas*, *Chlorella*).
- BNA 20 002: Mezcla de *Komvophoron* y *Muriellopsis*
- CBV 07070 6y: Mezcla dominada por *Oscillatoria*

e) Test de etanol

Durante 5 meses se dedicó mucho esfuerzo en probar una cepa adecuada de la levadura que se podría utilizar en nuestras pruebas.

Una cepa común de levadura de panadería (*Saccharomyces cerevisiae*) no tenía una tasa de crecimiento lo suficientemente alta para ser utilizada en las pruebas. Por ello se trató de adquirir una cepa adecuada, que también podría ser utilizado a temperatura ambiente (20-25°C), que sería mejor para nuestras pruebas.

Conclusión: Las pruebas para la producción de metano alcanzaron su objetivo que indica que las microalgas puede ser un sustrato adecuado para la producción de biogás, y que podemos utilizar cianobacterias como la fuente de bacterias metanogénicas para esta producción.

4.3.Subproyectos desarrollados por empresas.

4.3.1 Subproyecto de desarrollo y operación de una planta de demostración flexible para la producción de microorganismos fotosintéticos para la captura de CO₂ y su valoración para la producción de biocombustibles. Subproyecto ECOALGA.

Organismos responsables.

Abengoa Bioenergía Nuevas Tecnologías en alianza con la Universidad Politécnica de Cartagena, el Centro Nacional de Energías Renovables (CENER) y la Universidad de Murcia como instituciones de investigación asociadas.

Resultados.

La ejecución de este proyecto que comenzó en el último trimestre de 2010, tras la aprobación conjunta del plan de trabajo, se ha desarrollado durante 2011 y ha finalizado exitosamente en el pasado mayo meses después del comisionado de la planta anexa a la planta de producción de Bioetanol de Ecocarburantes Españoles en Cartagena.

El proyecto Ecoalga ha trabajado para desarrollar un proceso para fijar dióxido de carbono de las plantas de biocombustibles mediante la producción de microalgas, que integre la biomasa producida como materia prima para la producción de biocombustibles y alimento animal.

El proyecto ha concluido con éxito el diseño, construcción, comisionado y obtención de permisos de las instalaciones experimentales, flexibles, de 5000 m² de superficie, donde el equipo de investigadores e ingenieros involucrados en el proyecto algas ha realizado pruebas experimentales con el objetivo principal de validar la viabilidad tecno-económica de la producción industrial de microalgas integrada en plantas de producción de bioetanol y alimento animal.

Las instalaciones experimentales han contado con capacidades particulares que marcan la diferencia con respecto a las existentes:

- a. Suministro directo de CO₂ procedente de la fuente industrial
- b. Sin competir con el agua de regadío agrícola, la planta experimental puede ensayar, desde agua de mar, salobre o dulce, recicló del propio agua de proceso hasta corrientes residuales de la industria
- c. Disponer de varias tecnologías de producción comparables bajo las mismas condiciones ambientales y de operación
- d. Ha sido construida con un objetivo mayor donde desde materiales empleados hasta la instrumentación buscan alcanzar un concepto industrial viable
- e. Para cumplir con su objetivo experimental e independencia ha contado numerosos depósitos, sistemas de impulsión y red de tuberías que permitían alcanzar la versatilidad de modos de operación requeridos por los ensayos

- f. Varias plataformas de procesado de la biomasa donde se ensayan los procesos y alternativas que ya habían demostrado su viabilidad tecno-económica en menores escalas

Todo ello, comunicado con un sistema de control y adquisición de datos que ha facilitado la operación y recogido la información tanto meteorológica como de operación.

La instalación ha contado con 100 m² de laboratorio in situ que a pleno rendimiento ha producido los inóculos y controlado los cultivos al exterior, además de desarrollado una intensa labor de investigación en el aislamiento, caracterización y selección de los mejores organismos para ensayar.

Como resultado del proyecto se ha obtenido la caracterización y cultivo de especies potenciales para la producción de biocombustibles ejecutada en condiciones similares a las de una planta comercial, es decir condiciones climatológicas exteriores, alimentado de CO₂ procedente de la fermentación de cereal de la planta de Ecocarburantes Españoles, con medios de cultivo de bajo coste y recirculación de los mismos. El Proyecto ECOALGA ha recibido financiación del Ministerio de Economía y Competitividad, dentro del Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica 2008-2011, al amparo del Fondo especial del Estado para el Estímulo de la Economía y el Empleo, Plan E. Fondo de inversión local para el empleo-Gobierno de España

Al mismo tiempo se ha trabajado en pruebas piloto de las etapas de preconcentrado y concentrado de los cultivos, obteniendo una plataforma flexible de equipos piloto que han sido cuidadosamente seleccionados, teniendo en cuenta tanto rendimientos como costes a mayor escala.

La biomasa obtenida se ha empleado en los trabajos experimentales encaminados a evaluar los procesos y rendimientos de obtención de biodiesel y bioetanol. Por el estudio técnico-económico y el análisis de ciclo de vida realizado, se ha profundizado en el concepto de biorrefinería evaluando la biomasa generada como alimento animal por pruebas que van desde caracterizaciones químicas generales a las de la fracción proteica y empleando tanto métodos de análisis de regresión lineal entre las propiedades de la biomasa y precios de materias primas habituales para la formulación de piensos como softwares que actualmente se emplean en la compra de dichas materias primas.

La planta experimental ha centralizado toda la investigación en esta línea y producido biomasa que también se analizado y empleado para obtener biocombustibles y/o pienso animal en otros laboratorios colaboradores, entre los que destacan el laboratorio especializado en fermentación que la misma ABNT tiene en Sevilla, el Centro Nacional de Energías Renovables (CENER) o la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Murcia.

Conclusiones.

Según el informe de justificación técnica presentado, todas las actividades del subproyecto se han finalizado con el alcance y plazo previsto en la programación.

Si nos centramos en el organismo a cultivar, como puede demostrarse con el modelo económico se requiere de una microalga capaz de crecer fácilmente sin exigencias particulares y a lo largo de días y estaciones cambiantes. Esta productividad tiene que verse reflejada en la composición de la biomasa, principalmente carbohidratos y proteínas, aunque si bien no es el fin prioritario de las investigaciones, la valorización como pienso animal de la co-fermentación se antoja primordial desde un punto de vista tecno-económico para el éxito de esta tecnología.

Desde un punto de vista de su crecimiento, la recirculación del medio y el coste de los nutrientes impactan enormemente en la viabilidad de la tecnología como puede demostrarse con el modelo económico y las simulaciones de proceso.

Los sistemas de cultivo han de ser necesariamente de bajo coste, capaces de evitar la liberación a la atmosfera del CO₂ inyectado maximizando su biofijación, a diferencia de la energía de agitación que ha de ser minimizada. Su mantenimiento tiene que reducirse al mínimo, por debajo del 5% del coste del mismo por año.

Las tecnologías de cosechado requieren de altos rendimientos en las primeras fases unidos a bajos costes de operación, se requiere procesar miles de m³/h. La mejor alternativa que se ha estudiado, desde un punto de vista tecnoeconómico ha sido la co-fermentación con cereal, para incrementar los rendimientos a etanol por tonelada introducida en planta aprovechando la producción de CO₂ como fuente de carbono para el cultivo de microalgas y valorizando el subproducto obtenido junto con el etanol.



Fig. 4.3.1.1: Vista general de las instalaciones experimentales del proyecto ECOALGA

4.3.2. Subproyecto de construcción y puesta en operación de planta piloto demostrativa para producción de microalgas para la obtención de biodiesel.

Organismos responsables.

Acciona Energía y Acciona Biocombustibles, en colaboración con la Universidad de Almería.

Resultados y conclusiones.

Los trabajos realizados en el subproyecto se han llevado a cabo desarrollando las siguientes actividades:

- a. Cultivo de las microalgas.
- b. Cosechado y preparación de la biomasa.
- c. Extracción del aceite y transesterificación a biodiesel.
- d. Valorización de la biomasa.
- e. Evaluación económica y energética del proceso.

Para la primera actividad, “Cultivo de las microalgas”, se firmó un contrato de colaboración, que en total ha durado cuatro años, con el Dpto. de Biotecnología de Microalgas de la Universidad de Sevilla.

De entre las múltiples cepas o estirpes de microalgas existentes, se seleccionaron seis para la obtención de lípidos y posteriormente cinco para la obtención conjunta de lípidos y proteínas. Todas ellas son clorofíceas y las dos que más han destacado se denominarán Estirpe 1 y Estirpe 2 por motivos de confidencialidad.

Acciona se ha dotado de laboratorios dedicados exclusivamente al proyecto microalgas, en donde se pueden reproducir los trabajos de la Universidad de Sevilla referentes al estudio de las condiciones de cultivo y parámetros relevantes así como también detectar, separar y cultivar axénicamente cepas locales o autóctonas de microalgas. De hecho se ha trabajado ampliamente en la planta piloto de Acciona con una interesante microalga local también clorofícea (*Scenedesmus*).

Se firmó, en la misma fecha, un contrato de colaboración, que se ha desarrollado también a lo largo de cuatro años, con el Dpto. de Ingeniería de la Universidad de Almería con la finalidad, entre otras muchas, de llevar a cabo pruebas de cultivo a mayor escala en distintas tipologías de fotobiorreactores. Se han diseñado, probado y operado hasta siete tipologías distintas de sistemas de cultivo, tanto abiertos como cerrados, tanto “raceways” como tubulares, de bolsa y laminares. Todos estos aspectos relativos a la “Ingeniería de fotobiorreactores” han sido muy importantes para Acciona ya que conseguir un cultivo robusto, estable y masivo de microalgas es el primer paso para la escalabilidad de cualquier industria futura derivada de ellas. Tanto en la Universidad de Almería como en la planta piloto de Acciona en Caparroso, se ha comprobado que los sistemas de baja altura de cultivo son más productivos y estables y ello ha sido determinante para el planteamiento de escalado. Acciona ha apostado por sistemas laminares o de baja altura de cultivo y ha diseñado un sistema propio (patent pending) denominado JAN o sistema circular de baja altura de cultivo, que reúne muchas ventajas para ser muy competitivo y superar al estándar (“raceway”) en cultivos al exterior a gran escala.

Las productividades generadas por los sistemas escogidos superan los 25 g/m²·día, alcanzando incluso los 40 g/m²·día en condiciones óptimas de irradiación y temperatura.

En la segunda actividad, “Cosechado y preparación de la biomasa”, ha quedado patente la necesidad de utilización de floculantes (poli-electrolitos) para lograr una separación de las aguas madres de cultivo de la forma menos intensiva en costo y energía. El floculante a utilizar depende de las características físicas de la estirpe cultivada y de su concentración en el medio de cultivo. Es importante apuntar que mediante floculación-sedimentación podemos llegar a concentrar la biomasa por encima de veinte veces, esto es alcanzar factores de concentración y robustez del flóculo importantes que simplifican mucho el “downstream”. El siguiente paso es ya la utilización de centrifugas (energéticamente intensivas) o mejor aún técnicas de filtración, normalmente de menor costo y consumo de energía.

A día de hoy hemos podido reciclar las aguas madres del cultivo cinco veces sin disminuir productividad, acercándonos a nuestro objetivo de reciclado de más del 90%.

Se ha demostrado que la producción de microalgas con gases de combustión es totalmente factible, obteniéndose productividades idénticas a las obtenidas con CO₂ puro. Se ha mejorado la efectividad de inyección y fijación de CO₂ (superior al 90%). Se ha desarrollado un sistema de fijación de CO₂, desorción de O₂ y termostatación (SFDT) del medio de cultivo (patent pending), que es muy efectivo y con bajo coste para el importante aspecto del manejo de gases durante el crecimiento.

Se ha comprobado que la utilización de aguas residuales como fuente de nutrientes y agua para el cultivo continuo, estable y sin disminución de la productividad, es factible. Un aspecto importante ha sido el mantenimiento de la concentración de cultivo (evitando la dilución), que se ha conseguido mediante el uso de membranas adecuadas.

Para llevar a cabo los trabajos correspondientes a la tercera actividad, “Extracción del aceite y transesterificación a biodiesel”, se ha definido, diseñado y construido un laboratorio a escala piloto para poder tratar en condiciones de seguridad la biomasa de microalgas en lotes de kilogramos y así poder evaluar diversas técnicas y rutas extractivas en una escala superior a la de laboratorio. Se ha trabajado en el acondicionamiento de la biomasa mediante tratamientos enzimáticos, evaluando diferentes cócteles de diferente actividad que han sido efectivos a la hora de degradar la pared celular de las microalgas y mejorar el rendimiento de extracción de lípidos y pigmentos. Es necesario optimizar las condiciones de operación para reducir la dosificación de enzimas utilizadas y optimizar costos.

Respecto a las rutas extractivas evaluadas, la maceración con agitación y etanol como agente extractivo se considera la más interesante para el escalado a nivel laboratorio piloto y una de las más sostenibles a largo plazo. La ruta de saponificación se considera interesante para la obtención de pigmentos carotenoides, pero no tanto para la obtención de ácidos grasos, ya que hay una pérdida importante de los mismos.

La transesterificación en condiciones de catálisis ácida tiene el interés de que permite la transformación de ácidos grasos procedentes tanto de lípidos neutros como de lípidos polares, con lo que se consigue un mayor aprovechamiento de la fracción lipídica. La calidad del metiléster obtenido va a depender en gran medida de la estirpe de microalga con la que se trabaja y las condiciones de cultivo y, en menor medida, de las condiciones de extracción. El metiléster obtenido hasta ahora por Acciona (partiendo de aceite de microalgas sin hidrogenar), no cumpliría con la norma de calidad EN 14214 por su alto contenido en ácido linolénico, ya que la norma limita dicho contenido al 12% como máximo. Sin embargo se

podría evaluar su idoneidad para ser utilizado en mezclas con aceites y/o ácidos grasos procedentes de otras fuentes.

Con la cuarta actividad se pretende conseguir la viabilidad económica de la producción de biomasa de microalgas siguiendo un concepto de “biorrefinería”, esto es aprovechamiento integral de dicha biomasa, con el objetivo de mejorar la rentabilidad final del proceso y poder competir con los presentes y futuros precios de la energía de procedencia fósil.

Durante el desarrollo de esta actividad hemos tratado de analizar posibles rutas de procesamiento de la biomasa que nos condujeran de forma lo más viable posible al aprovechamiento de los productos de alto valor que podemos encontrar en dicha biomasa de microalgas. Compuestos tales como carotenoides (antioxidantes y colorantes naturales) así como los ácidos grasos poli-insaturados omega-3.

Se realizó una caracterización de la estirpe autóctona más utilizada en nuestras instalaciones, por parte de un laboratorio externo (OFICE, acreditado ISO 17025). En lo que respecta a pigmentos carotenoides, los resultados obtenidos arrojaron un contenido total en carotenoides superior a 4.000 mg/kg biomasa (base seca) predominando beta-caroteno y luteína.

Cabe destacar igualmente la importancia del contenido proteico de la biomasa de microalgas ya que éste puede considerarse, en muchos casos, de alto valor alimentario debido a su muy buen perfil de aminoácidos (algunos de ellos esenciales y de alto interés) si lo comparamos con el de la proteína de soja que es la referencia mundial. Podemos observar algunos datos en la siguiente tabla:

AAs (g/100 g proteína)	Estirpe 1	FAO	soja	<i>Spirulina</i>	<i>Chlorella</i>	<i>Dunaliella</i>
Aspártico	6,7	nd	1,3	11,8	9,3	10,4
Glutámico	8,0	nd	19,0	10,3	13,7	12,7
Serina	3,8	nd	5,8	5,1	5,8	4,6
Glicina	4,9	nd	4,5	5,7	6,3	5,5
Histidina	1,7	nd	2,6	2,2	2,0	1,8
Treonina	4,3	4,0	4,0	6,2	5,3	5,4
Alanina	7,3	nd	5,0	9,5	9,4	7,3
Arginina + Prolina	21,4	nd	7,4+5,3	7,3+4,2	6,9+5,0	7,3+3,3
Tirosina	3,0	6,0	3,7	5,3	2,8	3,7
Valina	4,1	5,0	5,3	7,1	7,0	5,8
Isoleucina	3,1	4,0	5,3	6,7	3,2	4,2
Leucina	7,2	7,0	7,7	9,8	9,5	11,0
Fenilalanina	3,8	nd	5,0	5,3	5,5	5,8
Lisina	4,6	5,5	6,4	4,8	6,4	7,0

Cualquier “negocio energético” a partir de biomasa de microalgas deberá tener muy en cuenta que el contenido proteico de dicha biomasa es normalmente superior al 50% (base seca) y que por tanto la proteína tendrá una muy alta incidencia en dicho negocio. Su conocimiento y aprovechamiento es, en cualquier caso, muy importante.

Finalmente la quinta actividad pretende realizar una “Evaluación económica y energética del proceso”. De dicha actividad y de acuerdo a los conocimientos adquiridos hasta el día de hoy, no consideramos posible desde Acciona lanzar un proyecto a escala industrial con fines energéticos. Esto es debido a los altos costos tanto de inversión como de operación en los que incurriríamos, quedando todavía aspectos importantes por desarrollar y madurar.

Los grandes retos del uso de microalgas como fuente de energía son:

- disminuir los costos de inversión
- disminuir los costos de operación
- conseguir la continuidad del cultivo con estirpes “robustas” y
- hacerlo de forma sostenible consiguiendo un balance energético positivo.

Acciona calcula que los costos de inversión (CAPEX) pueden estar entre los 0,4 a 1,2 MM€/ha y se debe seguir investigando para mejorar los costes de construcción, especialmente en lo referente a obra civil. Los costos de operación (OPEX) reflejados en los trabajos publicados van desde los aprox. 20.000€/ha.año hasta los 150.000€/ha.año dependiendo de la utilización/aprovechamiento o no de aguas residuales y/o gases de emisión. Los precios de biomasa de microalgas para energía en los distintos supuestos se encuentran en una amplia horquilla que va desde los 0,2€/kg a los aprox. 2€/kg. Acciona estima como “razonables” actualmente precios que van desde 50.000 a 150.000 €/ha en costes de operación (opex) y costes de la biomasa de entre 2,5 a 7,5 €/kg. Se resumen los datos en la siguiente tabla:

Concepto	Valor máx.	Valor mín.
COSTOS DE INVERSIÓN (CAPEX)	1.200.000 €/ ha	400.000 €/ ha
COSTOS DE OPERACIÓN (OPEX)	150.000 €/ ha	50.000 €/ ha
Estimación costo por kg biomasa	7,5 €/ kg.	2,5 €/ kg.

Acciona considera que la Sostenibilidad del proceso es muy importante para futuras generaciones y estima que es alcanzable un balance energético positivo. Dentro de este balance estamos alcanzando un consumo energético en la fase de cultivo que es cercano al 30% de la energía total fijada en la biomasa producida, solo ligeramente superior al muy ambicioso objetivo del 20 % descrito por expertos en la materia.

La sostenibilidad real del proceso global no ha sido todavía estudiada en profundidad, al menos con valores reales propios de producción industrial continua y no puede por tanto ser demostrada. Es una actividad inacabada y a la que se debe dar continuidad a lo largo de 2013.

Aunque a lo largo de estos últimos años Acciona ha realizado extraordinarios avances en el conocimiento de microalgas y especialmente en la tecnología de cultivo e ingeniería de sistemas de cultivo abiertos y fotobiorreactores, la empresa considera que aún es necesario

seguir investigando a lo largo de los próximos años y avanzando hasta demostrar la viabilidad industrial del cultivo consistente continuo y su escalabilidad.



(A)



(B)



(C)



(D)

Fig. 4.3.2.1: Modelos de fotobiorreactores utilizados en los experimentos.

4.3.3. Subproyecto de captura, fijación y valorización de CO₂ por medio de planta piloto ubicada en una central térmica del litoral.

Organismos responsables.

El subproyecto ALGAPLANE ha contado con la participación de la empresa privada ENDESA Generación, del Organismo Público de Investigación de la Universidad de Almería, así como del Centro Tecnológico de Investigación AITEMIN.

Resultados y conclusiones.

El resultado principal ha sido, según se preveía en los objetivos del proyecto, el desarrollo científico de un sistema de fijación y valorización de CO₂ mediante microalgas y su demostración a escala piloto en una planta ubicada en la central térmica de Litoral en Carboneras (Almería) propiedad de ENDESA.

Resultados científico-técnicos.

- Selección de microalgas y evaluación de sus capacidades en condiciones reales.

La investigación anterior al proyecto ALGAPLANE, se centraba en microorganismos de agua dulce. Sin embargo, en este Subproyecto se ha dado un paso más y se han seleccionado microalgas marinas, potencialmente más interesantes por su velocidad de crecimiento, capacidad de fijación de CO₂, composición bioquímica, tolerancia a factores ambientales y al cultivo en externo, sin olvidarse del hecho de la abundancia de agua de mar y la no competencia con cultivos agrícolas para el consumo humano.

Se han seleccionado las siguientes cepas: *Chlorella marina*, *Tetraselmis suecica*, *Nannochloropsis gaditana*, *Tetraselmis chuii* y *Phaeodactylum tricornutum*.

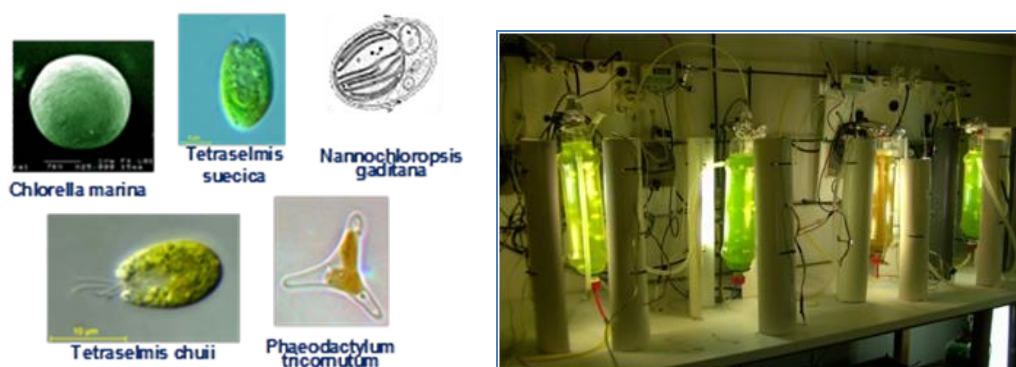


Fig. 4.3.3.1: Especies utilizadas y sistema de producción a pequeña escala.

Se ha llevado a cabo la optimización de parámetros de operación tales como el medio de cultivo, velocidad de dilución, estrategias para el incremento de la producción lipídica, etc. Se determinó el ratio óptimo de dilución y el medio de cultivo para cada cepa, llegándose a la conclusión de que la microalga *N. gaditana* era la más adecuada para continuar con la investigación debido a sus mayores productividades.

En cuanto a la evaluación de sus capacidades en condiciones reales, se han realizado ensayos en batch y se continuó empleando las tres tecnologías instaladas en la Universidad de Almería que ocupan una superficie de 330 m²: reactores tubulares, raceway, planos con orientación este-oeste y planos norte-sur.



Fig. 4.3.3.2: Producción en raceways

- Estrategias de operación y cultivo secuencial.

Los resultados de las dos estrategias llevadas a cabo han sido:

Estrategia A: Reducción gradual del aporte de nutrientes para inducir la acumulación de lípidos y cultivos en continuo en todos los diferentes tipos de fotobiorreactores.

Aunque durante las pruebas de menores concentraciones de nutrientes, el contenido en lípidos y ácidos grasos fue el mejor, la reducción en productividad de biomasa hizo que también bajase el rendimiento en generación de lípidos y ácidos grasos.

Estrategia B: Cultivo en dos fases y sin aporte de nutrientes.

La composición bioquímica de la biomasa generada al final de la segunda fase fue significativamente mayor en lípidos y ácidos grasos con una reducción en el contenido de proteínas.

- Operación y desarrollo de la experimentación con gases reales de combustión y agua de mar.

Para la operación con gases reales de combustión y agua de mar se ha diseñado, construido y puesto en marcha una ampliación de la planta piloto de microalgas ubicada en la central térmica de Litoral en Carboneras (Almería), propiedad de ENDESA Generación.

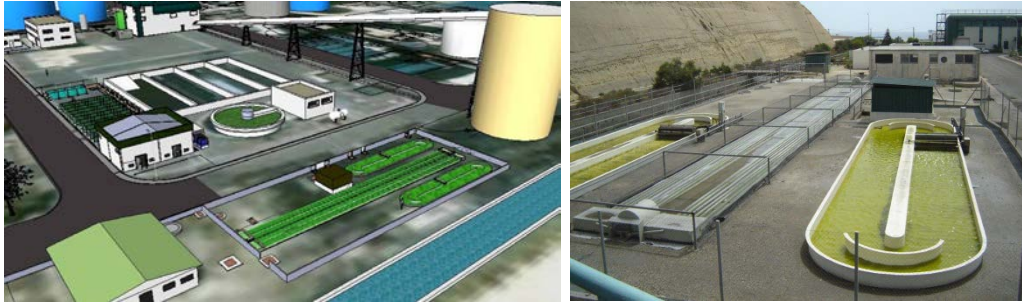


Fig. 4.3.3.3: Planta de producción fase II

La planta piloto inicial (fase I) de, aproximadamente, 580 m² se ha ampliado en unos 900 m² más. Esta nueva área de investigación (fase II), ha contribuido a establecer las bases y parámetros para el diseño de una planta de demostración de la tecnología propuesta.

También se ha instalado un laboratorio, completamente instrumentado y equipado con todo lo necesario para optimizar el desarrollo científico de la planta piloto.



Fig. 4.3.3.4: Laboratorio de control

Una vez construida y en operación la ampliación de la planta piloto, se ha desarrollado el conocimiento y la tecnología necesarios para optimizar el rendimiento de la misma, potenciar su capacidad y estudiar el comportamiento en condiciones reales con diferentes tipos de algas, utilizando agua de mar como recurso hídrico y gases reales de combustión provenientes de la Central Térmica de Litoral.

Se ha llevado a cabo un Plan de Pruebas, donde se han evaluado parámetros como la tasa de captura de CO₂, productividad de la biomasa, dificultades encontradas en la operación y mantenimiento, consumos energéticos, etc.

– Implantación de un sistema de control automatizado.

Los sistemas de producción de microalgas han sido tradicionalmente de pequeño volumen y se operan casi de forma manual, lo cual resulta inviable en procesos industriales a gran escala. En este sentido, resulta imprescindible el desarrollo de sistemas de control específicos que permitan operar los procesos de producción de microalgas de forma automatizada.

En este proyecto se ha diseñado e instalado un Sistema de Control optimizado y automatizado para la ampliación, integrándolo en el Sistema de Control implementado en toda la planta piloto.



Fig. 4.3.3.5: Sistema de Control optimizado y automatizado

- Desarrollo y operación con nuevos diseños de fotobiorreactores.

En la ampliación de la planta piloto se han ubicado nuevos equipos de fijación biológica, 2 unidades de fotobiorreactores raceways de 20m³ de capacidad y un fotobiorreactor tubular horizontal semicerrado con capacidad de 8m³.

Además AITEMIN ha desarrollado un fotobiorreactor de segunda generación, con mejoras clara en cuanto a operación y mantenimiento, que se ha instalado en la fase I de la planta piloto. Mediante la modelización CFD se han estudiado mejoras de diseño en determinadas zonas del fotobiorreactor, simulando un movimiento real, para conseguir un flujo de gas semejante a la realidad en un modelo simplificado.



Fig. 4.3.3.6: Fotobiorreactor de segunda generación

- Estrategias integrales de valorización de la biomasa.

Se han desarrollado diferentes procesos de valorización, todos ellos con rendimientos de extracción superiores al 95%:

- Obtención de ésteres metílicos (EM, biodiesel) de la biomasa microalgal mediante:
- Obtención de ácidos grasos libres por:
- Extracción de lípidos saponificables:

Resultados medioambientales.

- Demostración a escala piloto de procesos de reducción de emisiones de gases de combustión, en concreto, la fijación de CO₂ mediante microalgas.
- Desarrollo, para su escalado a nivel industrial, de biocombustibles producidos a partir de algas, que ha concluido con un diseño para una planta piloto de extracción de biodiesel.
- Contribución a la reducción en la dependencia energética de España respecto a los combustibles fósiles.
- Introducción de un programa de sustitución, de productos químicos convencionales, por otros respetuosos con el medio ambiente en colaboración con la compañía química BASF.

Resultados sociales.

- Creación de 15 puestos de trabajo directos en investigación y desarrollo, así como en el diseño y la operación de la planta piloto.
- Creación de 14 puestos de trabajo indirectos en las distintas actividades desarrolladas; construcción de la planta piloto (industrias de obra civil, metal y calderería,...), suministradores de equipos, montaje (instaladores industriales) y mantenimiento de la planta piloto, industria auxiliar agrícola, etc.
- Creación a futuro de puestos de trabajo si los resultados del proyecto se trasladan a la instalación de una planta de demostración, de mayores dimensiones, así como el establecimiento de un nuevo sector de actividad industrial.

4.3.4. Subproyecto de demostración del cultivo y procesado de microalgas en sistemas semicerrados con fertilización carbónica en el entorno de una refinería.

Organismos responsables.

El subproyecto ha sido desarrollado por Repsol YPF con el Institut de Recerca en Energí de Catalunya como entidad científica asociada.

Resultados y conclusiones.

El proyecto de demostración de cultivo y procesado de algas en sistemas semicerrados con fertilización carbónica en el entorno de la refinería de Repsol en Tarragona, busca demostrar la potencialidad de las algas para ser utilizadas como materia prima para la producción de biocombustibles frente a los cultivos terrestres. Esto se debe principalmente a su alta productividad en índices de biomasa, a que no requieren suelo fértil ni agua de buena calidad, tampoco pesticidas para crecer, como también es importante resaltar su alto potencial de captura de CO₂ industrial.

Además, las aplicaciones energéticas y alimentarias de las algas no son excluyentes. El proyecto liderado por Repsol, enmarcado en el Plan E del Ministerio de Ciencia e Innovación, contó con la participación del Institut de Recerca en Energí de Catalunya (IREC) para el diseño, construcción, puesta en marcha y operado de la planta piloto de producción y cosechado de microalgas con fertilización carbónica.

Así, este proyecto se ha desarrollado en cooperación para demostrar, a través de una planta piloto, la viabilidad técnica y económica de la producción de biomasa proveniente del cultivo de microalgas en sistemas semicerrados con fertilización carbónica. La productividad del sistema se ha estudiado utilizando CO₂ no depurado proveniente de la refinería de Repsol en Tarragona. Los resultados obtenidos han sido muy positivos ya que se ha logrado un buen ratio de inversión frente a rendimiento al reducir costes y aumentar la eficacia a partir de la separación de la algas. Por otro lado, se ha observado una muy alta flexibilidad del sistema al poder seleccionar diferentes tipos de cepas, así como la cantidad de biomasa a generar, diferentes nutrientes o condiciones del cultivo, entre otros factores.

El éxito alcanzado supone un primer paso para el uso futuro de nuevos cultivos, constituyendo la planta piloto desarrollada una instalación singular para continuar la experimentación en el crecimiento, cosechado y post-tratamientos para obtener biocombustibles y bioproductos de alto valor añadido.



Instalación de fotobiorreactores a escala piloto